

論文の内容の要旨

論文題目 Development of practical multiplex SNP typing system
for inferring ethnic background of forensic samples

和 訳 マルチプレックス SNP タイピングによる法医学的試料のための
民族推定法の開発

指導教員 吉田 謙一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年4月 入学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 高橋 麻衣子

英文要旨

This study is the first practical method for inferring the ethnicity of forensic DNA samples. The globalization of society and economy has resulted in a serious increase in the number of crimes committed by foreign nationals visiting Japan. In criminal investigation, the successful estimation of the ethnic origin of an individual from low-quantity or low-quality DNA specimens helps focus the investigation on specific suspects. We aimed to establish an ethnic estimation kit for these forensic specimens. To discriminate individuals of three major continental populations, 32 loci among the autosomal single nucleotide polymorphisms (SNPs) were selected from the HapMap project database. Principal components analysis confirmed that these SNPs can discriminate Yoruba, European, and Asian populations, but could not discriminate Han

Chinese from Japanese in the Asian population. We applied the DigiTag2 method for forensic SNP typing by amplifying 32 SNP loci in a single PCR reaction and detected SNP alleles by a DNA chip. The DigiTag2 kit could successfully discriminate three ethnic groups by using a small amount of DNA template (1 ng) and could genotype a larger portion of the 32 SNP loci even from highly degraded DNA (call rate 83.7%, concordance rate 90.0%). These results indicate that 32-locus SNP typing with the DigiTag2 method is useful for discriminating three major ethnic populations from low-quantity or degraded DNA from forensic specimens. In addition, estimation of the optimal number of SNP loci necessary for differentiation of the Asian populations was performed, revealing that Japanese could be distinguished from other Asian populations by analyzing 500 informative SNPs. This result indicates that a population-infering system for Asian individuals could be established with 500 SNPs.

和文要旨

事件の初動捜査においては、現場に遺留された被疑者の血痕、体液などの試料が由来する民族を推定するために、捜査現場で簡便・迅速・低コストに使うことができ、かつ信頼性の高い民族推定法を早急に開発することが求められているが、国内外ともに、この必要性を満たす技術は開発されていなかった。本研究で用いた単一塩基多型 (SNP) は、ゲノム中に 500~1000 万種類、平均して約 300~600 bp ごとに 1 個の SNP があると推定され、種々の遺伝子多型の中で最も種類数が多い。さらに、多型情報のデータベースが充実しており、膨大な数の多型情報を得ることができる。本研究では、数十~数百の SNP を同時に高い成功率でタイピングできる新規マルチプレックス SNP タイピング技術 DigiTag2 法を用いた。

第一段階として、HapMap プロジェクトによるヨーロッパ系アメリカ人、ナイジェリアの Yoruba 族、東アジア人 (漢民族系中国人・日本人) の SNP データに基づき、これらの 3 大人類集団を識別するための SNP 数を検討するため、8、16、32、96 個の SNP によるセットを構築し、近隣結合法による系統樹解析及び主成分分析により分離精度を確認した。8 個の SNP セットでは誤分類が生じたため SNP 数不足と判明したが、それ以上の数のセットでは、3 大人類集団が明瞭に区別できていた。検討の結果、実用的な SNP セットとするため、分離度及び簡便性、経済性を考慮し、32 個の SNP セットが適していると判断した。2 回の試行を経て、32 個の SNP による 3 大人類集団識別用 SNP

セットを構築した。本研究においては、DNA が分解している可能性の高い法医学的試料に適用することが目的であるため、通常の DigiTag2 法で用いるよりも PCR 増幅産物が短くなるようにプライマーを設計した。クオリティの良いゲノム DNA に対しては、マルチプレックス PCR のテンプレートとして用いる DNA 量が DigiTag2 法の至適量 25 ng より少量のわずか 1 ng でも、高い成功率でタイピングが可能であった。また、分解 DNA をテンプレートに用いた場合でも、1 つの SNP を除き、タイピングに成功した。一方、微量 DNA から大量の DNA を得ることができる全ゲノム増幅法 (WGA) により増幅したテンプレート DNA を用いた場合には、タイピング成功率は向上しなかった。

民族推定のシミュレーションとして、32 個の SNP のうち、20 個しかタイピングできなかった漢民族系中国人のサンプルについて、この 20 個のみの SNP タイピングデータによる主成分分析を行ったところ、3 大集団のクラスターが明瞭に分離され、本サンプルは漢民族系中国人のクラスターに含まれることが確認された。これより、本研究により構築された 3 大集団識別のための SNP セットは、法医学的試料のための民族推定法として、正しく機能していることが示唆された。

第二段階として、日本人と遺伝的に近縁にあるアジア系民族 5 集団の SNP データに基づき、アジア系民族を識別するための SNP を選択し、アジア系民族識別用 SNP セットを構築するため、系統樹解析及び主成分分析によるシミュレーションを行い、必要 SNP 数の検討を行った。この結果、500 個の SNP を使用した場合、日本人集団を

他の東アジア系民族集団から分離できることが判明した。しかし、現行の DigiTag2 法では 500 個の SNP をタイピングすることができないため、今後、この 500 個の SNP をタイピングする方法についての研究を行いたい。あるいは、現在のデータベースに掲載されていない新しい有用な SNP が発見され、SNP セットに追加することができれば、アジア人の識別に必要な SNP 数を減らすことが可能となるため、SNP セットの改善も併せて検討していく。

SNP タイピングは、DNA の混合を判別できないという欠点がある。そのため、実務では、本研究で構築された民族識別法を行う前に、STR 検査等で混合の有無を確認する必要がある。また、民族の混合（いわゆるハーフ等）が疑われるサンプルの場合の実験はまだ行われていないため、今後データを収集し、判定方法について検討したい。

本研究によって開発された民族・集団識別法が実用化されることにより、事件の初動捜査で犯人の民族集団が明らかになれば、その後の捜査方針が決まり、事件の早期解決が見込まれる。さらに、外国人が関与したと考えられる過去の未解決事件（コールドケース）のサンプルについて民族識別法による検査を行うことによって、解決の一助となることが期待される。また、犯罪捜査以外に、シベリア、南方地域等における海外戦没者の遺骨収集において、DNA 型による個人識別や血縁鑑定の前段階として日本人と外国人を識別することができると考えられる。